

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461370

研究課題名(和文) Caveolin-1の新規機能とHDL新生の調節

研究課題名(英文) The new function of caveolin-1 in the ABCA1-mediated HDL biogenesis

研究代表者

呂 銳 (LU, Rui)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：80381862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜にあるABCA1蛋白レベルは、遺伝子の転写発現による制御のほか、安定性や分解などの翻訳後制御を受け、HDL産生の制御に深く関わっていると考えられる。我々はcaveolin-1がABCA1の分解制御と安定化に関わることを見だし、その分子機構を研究してHDL新生への関与について研究を進めた。ABCA1の細胞内への移行はcaveolin-1との相互作用が必要であり、SQとDQはABCA1とcaveolin-1の相互作用を阻害することにより、ABCA1の細胞内への移行とその分解を抑制し、タンパク質の発現が増加してHDLの産生を促進すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of ATP binding cassette transporter (ABC) A1, a key membrane protein for biogenesis of high-density lipoprotein (HDL), is regulated not only by its gene transcription but also by its intracellular degradation to modulate plasma HDL concentration. We here undertook investigation of the role of caveolin-1 in the ABCA1-mediated HDL biogenesis in order to understand how cell cholesterol homeostasis is regulated by caveolin-1 function. In this study, we conclude that caveolin-1 enhances internalization and degradation of ABCA1 by its association with ABCA1. Interference of this interaction by probucol oxidative products suppresses ABCA1 degradation and increase HDL biogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ABCA1 caveolin-1 HDL

1. 研究開始当初の背景

血中 HDL コレステロール低下は、LDL コレステロール増加とならんで代表的な冠動脈疾患の危険因子であり、HDL の増加により血管壁からのコレステロールの除去等とそれによる粥状動脈硬化の悪化の防御が相当程度期待される。LDL 低下による予防効果に限界がある我が国に於いてはとりわけ重要な次世代への研究課題である。HDL 粒子の産生には膜蛋白質である ABCA1 が必須で、その存在下で apoA-I などヘリックス型アポリポ蛋白が細胞リン脂質とコレステロールに反応して HDL 粒子を新生する。ABCA1 遺伝子変異による活性消失や薬剤 probucol による活性阻害は血漿 HDL の消失 (Tangier 病など) を招き、この反応が HDL の殆ど唯一の産生源であることが分かる。従って、ABCA1 の発現と活性の調節は脂質恒常性改善と HDL 増加による動脈硬化性疾患予防治療の重要な標的である。

2. 研究の目的

本研究計画は、Caveolin-1 が細胞内ステロール代謝平衡に果たす具体的役割を新しい見地から解明する研究である。細胞からのコレステロール放出は末梢細胞のステロール代謝平衡において異化システムに繋がる唯一の反応であり、その重要な経路の一つは膜タンパク質 ABCA1 を介した HDL 産生による細胞コレステロール搬出である。ABCA1 はその分解による翻訳後制御が重要な活性調節の機構であり、我々の予備実験成績は caveolin-1 が ABCA1 と相互作用して ABCA1 の分解制御に関わり HDL 新生反応を調節することを示した。本研究ではその機序を具体的に

明らかにし、動脈硬化性血管疾患の予防治療技術開発に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ABCA1 と caveolin-1 の相互作用が ABCA1 の活性に及ぼす影響について、HDL 新生反応を指標として ABCA1 比活性を測定する。

(2) 相互作用の分子構造学的基礎について、ABCA1 分子と caveolin-1 分子の相互作用部位を同定し、その相互作用の制御機構解明の基礎的知見を得る。

(3) ABCA1/caveolin-1 相互作用の調節因子を探索し、ABCA1 発現と HDL 新生の制御の生理的意義を解明する。

(4) 制御因子による相互作用の調節と HDL 産生制御を *in vitro/in vivo* で観察し、また probucol、SQ、DQ などのその薬理的調節化合物の作用機構の分子構造学的基礎を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Caveolin-1 による ABCA1 タンパク質発現の制御

マウス胎児性繊維芽細胞の野生型、caveolin-1 欠損型、caveolin-1 を強制発現した caveolin-1 欠損細胞を用いて ABCA1 タンパク質の発現及び拳動について検討した。caveolin-1 欠損型細胞は野生型細胞と比べ、ABCA1 タンパク質の発現レベルは高く、ABCA1 の分解速度及び細胞内への移行速度を低下した。この細胞に caveolin-1 を強制発現させると、ABCA1 タンパク質の分解速度及び細胞内への移行速度の低下は回復した。

(2) ABCA1 の caveolin-1 metabolism に及ぼす影響

マウス胎児性繊維芽細胞の野生型、ABCA1 欠損型細胞を用いて caveolin-1 タンパク質の発現、分解速度、核内への移行について検討した。ABCA1 欠損細胞は野生種と比較して、caveolin-1 の発現及びタンパク質の分解速度は差を見られなかった。また、ABCA1 の欠損は caveolin-1 タンパク質の発現に影響しないことを示した。ABCA1 欠損細胞と野生種を比較して、caveolin-1 の細胞内への移行速度を低下させた。

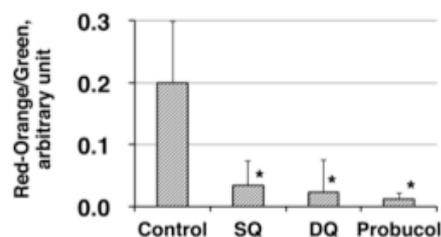
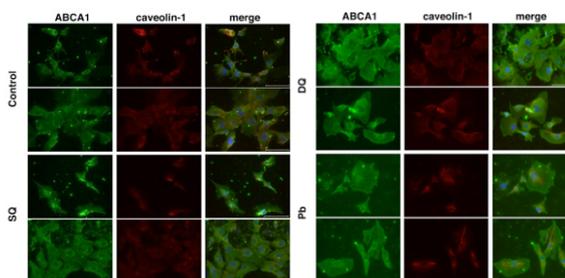
(3) ABCA1 と caveolin-1 の相互作用

我々は caveolin-1 野生型 MEF 及び欠損 MEF 細胞に SQ と DQ を添加し、ABCA1 タンパク質の発現レベルを検討した。野生型 MEF 細胞では、SQ, DQ により ABCA1 蛋白質発現の増加がみられますが、欠損細胞では、この増加を消失する。そこで Caveolin-1 欠損 MEF 細胞に caveolin-1 を強制発現させると、SQ, DQ による ABCA1 発現増加効果が回復した。また、SQ, DQ の apoA1 による細胞 cholesterol 排出の増加も caveolin-1 欠損によりキャンセルされ、caveolin-1 発現により回復した。

次に、ABCA1 と Caveolin-1 の直接相互作用について ABCA1 と caveolin-1 の抗体を用いて免疫沈降を行った。ABCA1 と caveolin-1 の直接の interaction が見られた。また、probucol の酸化物 spiroquinone (SQ) と diphenoquinone (DQ) の添加により、その相互作用が阻害された (Figure 1)。これらの反応の条件下の培養細胞で、蛍光色素による免疫組織染色により、生化学的に示された相互作用を蛍光画像として確認した。ABCA1 は caveolin-1 と細胞膜で共存し、SQ, DQ はこの

共存を干渉することが観察され免疫染色法により ABCA1 と caveolin-1 の細胞内の共存を調べた結果も同じでした。このように、ABCA1 の細胞内への移行は Caveolin-1 との相互作用が必要であり、probucol の酸化物である spiroquinone と diphenoquinone は ABCA1 と Caveolin-1 の interaction を阻害することにより、

ABCA1 の細胞内への移行を抑制し、タンパク質の発現が増加し、HDL の産生を促進すると示唆された (Fig1)。この効果を動物実験で確かめるため、防衛医科大学老年内科の綾織等との共同研究を行い、動脈硬化促進マウスである apoE 欠損マウスを用いて、SQ, DQ の投与による HDL 増加と動脈硬化進展の抑制を示すことができた。



(Fig1)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Maki Tsujita, Mohammad Anwar Hossain, Rui Lu, Tomoe Tsuboi, Kuniko Okumura-Noji and Shinji Yokoyama
Exposure to High Glucose Concentration Decreases Cell Surface ABCA1 and HDL Biogenesis in Hepatocytes J Atheroscler Thromb. (2017) 24 査読あり

DOI: <http://doi.org/10.5551/jat.39156>

- ② Emi Yakushiji, Makoto Ayaori, Takafumi Nishida, Kazusa Shiotani, Shunichi Takiguchi, Kazuhiro Nakaya, Harumi, Uto-Kondo, Masatsune Ogura, Makoto Sasaki, Makiko Yogo, Tomohiro Komatsu, Rui Lu, Shinji Yokoyama, Katsunori Ikewaki. Probucoyl Oxidized Products, Spiroquinone and Diphenylquinone, Promote Reverse Cholesterol Transport in Mice (2016) Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. (2016) 36: 591-597. 査読あり

DOI:<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306376>

- ③ Rui Lu, Tomoe Tsuboi, Kuniko Okumura-Noji, Noriyuki Iwamoto, and Shinji Yokoyama Caveolin-1 facilitates internalization and degradation of ABCA1 and probucoyl oxidative products interfere with this reaction to increase HDL biogenesis. Atherosclerosis (2016) 253: 54-60. 査読あり

DOI:<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.025>

[学会発表] (計5件)

- ① 石河貴大、呂 銳、横山信治

ABCA1分解による活性制御と無機栄養因子による調節

第37回日本臨床栄養学会総会 第36回日本臨床栄養協会総会

2015年10月2～4日 都市センターホテル

東京都千代田区

- ② 呂 銳、山口知恵、野路久仁子、横山信治：
膜蛋白質機能制御の新規薬剤標的としてのカベオリン-1 相互作用

第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会

2015年7月9～10日 仙台国際センター

宮城県仙台市

- ③ 石河貴大、呂 銳、横山信治

ABCA1 分解による活性制御と無機栄養因子による調節

第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会

2015年7月9～10日仙台国際センター

宮城県仙台市

- ④ Ayaori M, Yakushiji E, Takiguchi S, Uto-Kondo H, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Lu R, Yokoyama S, Ikewaki K.

Probucoyl oxidized products, spiroquinone and diphenylquinone, promote reverse cholesterol transport in mice

European Society of Cardiology Meeting

August 29 - September 5, 2014, Barcelona, Spain.

- ⑤ 呂 銳、野路久仁子、横山信治

Modulation of HDL Biogenesis Through Regulation of ABCA1 Degradation Involvement of Caveolin-1

第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会

2014年7月10～11日 京王プラザホテル

東京都新宿区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

呂 銳 (LU, Rui)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号 : 80381862

(2) 研究分担者

横山 信治 (YOKOYAMA, Shinji)

中部大学・応用生物学部・特任教授

研究者番号 : 10142192